Aus dem physiologischen Institut der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. U. Ebbecke

„Über die Einwirkung von Calcium-Ionen auf die Glykolyse und Pyrophosphatspaltung in der Muskulatur."

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn.

Vorgelegt am 30. Mai 1938

von

Siegfried Hollmann

aus Bonn.

BONN 1938

Anton Brand, Bonn.

Gedruckt
mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Bonn.

Referent: Prof. Dr. Deuticke
Korreferent: Prof. Dr. Ebbecke

Meinem Vater!

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Im Jahre 1924 erschien aus dem Embden'schen Institut (Embden, Lehnartz [1]), Deuticke [2]), Haymann [3])) eine Reihe von Arbeiten „über die Bedeutung von Ionen für die Muskelfunktion", in denen gezeigt wurde, daß Anionen und Kationen entscheidend in den Phosphatstoffwechsel der Muskulatur eingreifen. Von den Anionen bewirkten je nach ihrer Stellung in der Hofmeister'schen lyotropen Reihe die quellungsbegünstigenden Ionen eine Vermehrung, die entquellenden Ionen eine Verminderung der anorganischen Phosphorsäure, und zwar sowohl im Muskelbrei wie auch im Muskelpreßsaft. Die stärkste Abnahme des anorganischen Phosphates wurde durch Zusatz von Fluorid, Oxalat und Lactat erzielt. Als Syntheseprodukt konnte zunächst aus Muskelpreßsaft Hexosediphosphorsäure isoliert werden (Embden u. Haymann [3]), Embden u. Zimmermann [4])), aber später zeigte sich, (K. Lohmann [5])), daß im Muskelbrei diese Hexosediphosphorsäure unter Fluorideinwirkung schnell in einen schwer spaltbaren Ester umgewandelt wird, der von G. Embden, H. J. Deuticke u. G. Kraft [6]) als linksdrehende Phosphoglycerinsäure isoliert und identifiziert wurde. Durch die Versuche von Embden u. Deuticke [7]) wurde ferner klargelegt, daß diese Anhäufung von Phosphoglycerinsäure unter Einwirkung von Fluorid, Oxalat und Lactat weniger auf einer gesteigerten „Synthesefähigkeit" als vielmehr auf dem Unvermögen der Muskulatur beruht, Phosphoglycerinsäure in Phosphorsäure und Brenztraubensäure zu spalten, während die Umwandlung der Hexosediphosphorsäure über Triosephosphorsäure in Phosphoglycerinsäure und Glycerinphosphorsäure, wie auch die reduktive Umwandlung der Brenztraubensäure in Milchsäure ungestört verlaufen. Spätere Untersuchungen von Meyerhof und Lohmann [8]) ergaben allerdings, daß die Dephosphorylierung der Phosphoglycerinsäure in zwei Phasen unter intermediärer Bildung von Phosphobrenztraubensäure verläuft

und daß bei Fluorideinwirkung nur die Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Phosphobrenztraubensäure gehemmt ist, die Dephosphorylierung der Phosphobrenztraubensäure ungehindert vonstatten geht.

Von den seinerzeit gleichfalls untersuchten Kationen (H. Lange[9]), C. Emmrich u. H. Lange[10])) wirkte ähnlich wie das Fluorid und Oxalat das Calcium „synthesebegünstigend", d. h. sein Zusatz führte ebenfalls zum Verschwinden von anorganischem Phosphat. Aber das Calcium ist besonders dadurch interessant, daß seine Wirkung nicht wie bei den erwähnten Anionen in einer bestimmten proportionalen Beziehung zur Konzentration steht, sondern daß unter zwei ganz verschiedenen Calciumkonzentrationen zwei Minima an anorganischem Phosphat zutage treten.

In der vorliegenden Arbeit, die auf Veranlassung von Herrn Professor Deuticke durchgeführt wurde, sollte untersucht werden, ob die Wirkung des Calciums auf den Phosphatstoffwechsel der Muskulatur die gleiche ist wie die der „synthesebegünstigenden" Anionen und ob die beiden Minima an anorganischem Phosphat unter verschiedenen Calciumkonzentrationen auf der Anhäufung des gleichen organischen Phosphorsäure-Esters beruhen.

Methodik.

Zu den Versuchen wurde Hinterschenkelmuskulatur von Temporarien oder Kaninchenmuskulatur verwandt, die unmittelbar nach dem Tod der Tiere mit der Schere auf eisgekühlter Glasplatte oder in einer eisgekühlten Fleischhackmaschine zu einem möglichst homogenen Brei zerkleinert war. Gleiche Breiportionen wurden in Erlenmeyerkölbchen, die mit den entsprechenden $CaCl_2$-Lösungen und gegebenenfalls weiteren Zusätzen beschickt und analytisch vorgewogen waren, nach einer zweiten analytischen Wägung zwei Stunden bei Zimmertemperatur unter häufigem Schütteln exponiert. Durchschnittlich kam auf 1 g Brei 3 ccm Expositionslösung. Die Fällung erfolgte

entweder nach Schenck mit den gleichen Volumina 4%iger Salzsäure und 5%igem Sublimat oder mit einem Trichloressigsäure — (5%) Salzsäure — (1%) Gemisch. In jedem Versuch wurden ausserdem in einem Ansatz A die Werte zu Versuchsbeginn ermittelt. Am nächsten Tage wurden im entquecksilberten Schenckfiltrat bzw. im Trichloressigsäurefiltrat die anorgan. Phosphorsäure (o — Phosphorsäure + Phosphokreatinphosphorsäure) nach Embden [11]) als Strychninphosphormolybdat, die Pyrophosphorsäure nach K. Lohmann [12]), Milchsäure nach E. Lehnartz [13]) und Hexosediphosphorsäure nach einer neu ausgearbeiteten Methode (siehe Seite 16) bestimmt. Als Zusätze wurden verwandt:

$CaCl_2$-Lösung, titrimetrisch eingestellt;

Glykogen, aus Hundeleber dargestellt;

Na-Hexosediphosphat, aus Candiolin über das Bleisalz gereinigt;

Na-Phosphoglycerinat, aus Kaninchenmuskulatur als saures Ba-Salz nach Embden, Deuticke u. Kraft [6]) dargestellt.

Versuchsergebnisse.

Im Versuch 1 wurde zunächst die von Lange [9]) festgestellte zweiphasige Wirkung einer Calciumkonzentrationsreihe auf das anorgan. Phosphat im Froschmuskelbrei bestätigt. Das erste Minimum an anorganischem Phosphat lag in diesem unter

Versuch 1

(Prot. Nr. 2. 4. XI. 35.)

Zweistündige Exposition von Froschmuskelbrei in 2 m bis m/128 $CaCl_2$-Lösung, die gleichzeitig 0,4% Glykogen und 2% Natriumbicarbonat enthielt. Expositionstemperatur 20°.

$CaCl_2$—Konz.	A-Wert	2 m	m	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128
Anorg. H_3PO_4 in mg% der Muskulatur	306,4	265,6	281,3	293,7	238,7	204,7	320,0	336,0	336,1	371,9

Bikarbonatzusatz angestellten Versuch bei 2 m $CaCl_2$, und zwar 13% unter dem A-Wert, das zweite Minimum bei m/8. Hier war das anorgan. Phosphat um 33% gegenüber dem A-Wert gesunken.

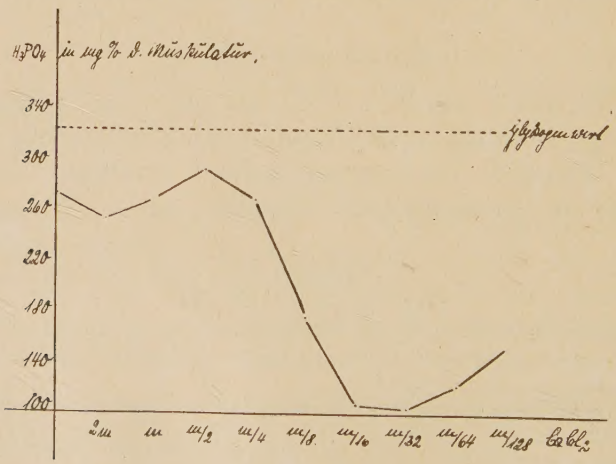
Im Versuch 2, der wegen der Minderung der Calciumkonzentration durch ausfallendes Calciumcarbonat ebenso wie alle folgenden Versuche ohne Pufferung mit Na-Bicarbonat durchgeführt wurde, waren, wie die folgende Figur zeigt, die beiden Minima bei 2 m bezw. m/32 $CaCl_2$ gelegen. Die Senkung gegenüber dem A-Wert betrug 7,3 bezw. 62%. Da auch in fast allen weiteren Versuchen die beiden Minima immer bei 2 m und m/32 $CaCl_2$ lagen, fanden diese beiden Konzentrationen in Zukunft weiterhin als die optimalen Anwendung.

Versuch 2

(Prot. Nr. 4. 26. XI. 35)

Zweistündige Exposition von Froschmuskelbrei in 2 m bis m/128 $CaCl_2$ und 0,4% Glykogen.

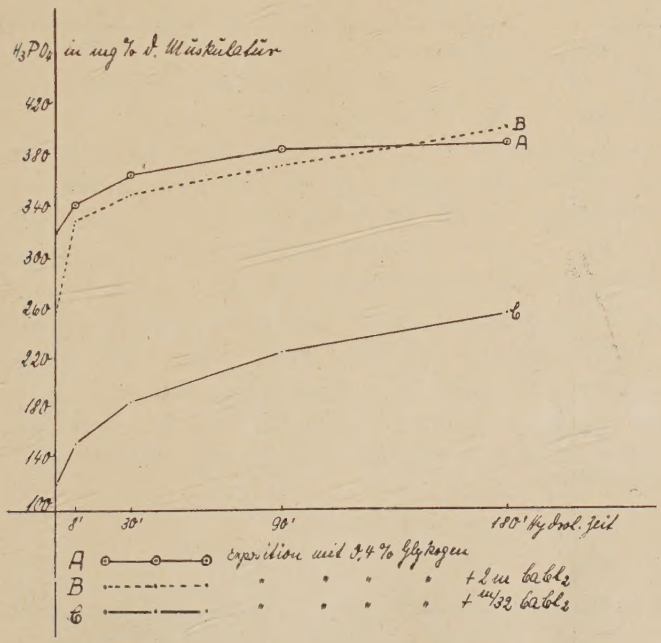
A-Wert: 274 mg% anorgan. H_3PO_4.



Zur Feststellung der Natur der unter diesen optimalen Calciumkonzentrationen entstehenden Phosphorsäureester wurden im Versuch 2 vom Filtrat dieser Ansätze, sowie vom Filtrat

eines Ansatzes, in dem frische Muskulatur 2 Stunden mit 0,4 % Glykogen allein exponiert und die anorgan. Phosphorsäure um 19 % auf 325 mg % angestiegen war, auch Hydrolysenkurven nach den Angaben von K. Lohmann [14]) aufgenommen (siehe untenstehende Figur). Wie man sieht, übersteigt bei anfänglich besonders steilem Kurvenanstieg der Hydrolysen-Endwert des 2 m $CaCl_2$-Ansatzes (Kurve B) um ein Geringes den Hydrolysen-Endwert des Kontrollansatzes (Kurve A), ein Verhalten, das sich in allen derartigen Versuchen zeigte und das darauf hinwies, daß unter Einwirkung von 2 m $CaCl_2$ vermutlich ein leicht spaltbarer Ester entstanden war. Ganz im Gegensatz dazu

Versuch 2, Hydrolysenkurven.



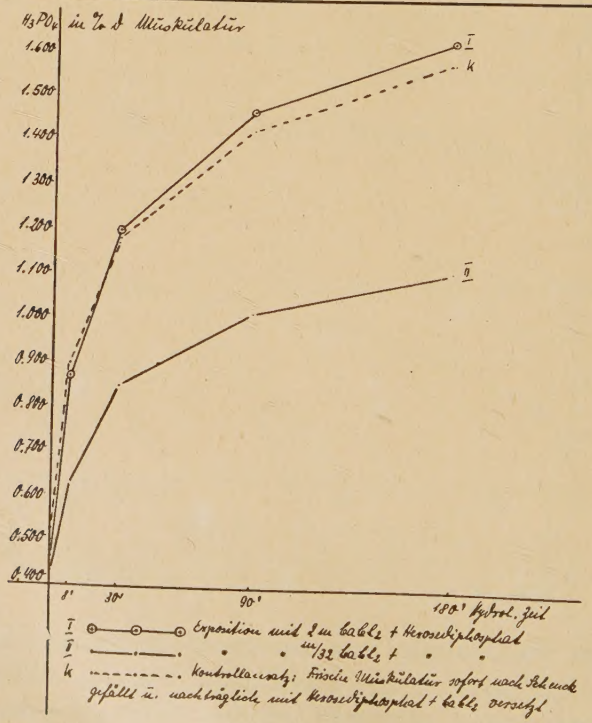
beruht das Verschwinden von anorganischer Phosphorsäure nach m/32 $CaCl_2$-Zusatz in der Muskulatur auf der Bildung eines schwer hydrolysierbaren H_3PO_4-Esters, (Kurve C) der, falls es

Versuch 3

(Prot. Nr. 5. 10. XII. 35.)

Exposition von Kaninchenmuskelbrei mit 2 m und m/32 $CaCl_2$ unter Zusatz von Na-Hexosediphosphat (10 mg organ. H_3PO_4 pro g Muskulatur.)

	K_1	I	K_2	II
	2 m $CaCl_2$ + Hexosediphosphat		m/32 $CaCl_2$ + Hexosediphosphat	
	Zusatz von Ca + Hexosediph. nach der Schenckfällung	2 Stunden Exposition mit Ca + Hexosediph. dann Schenckfällung	Zusatz von Ca + Hexosediph. nach der Schenckfällung	2 Stunden Exposition mit Ca + Hexosediph. dann Schenckfällung
Anorgan. H_3PO_4 in mg% der Muskulatur	519,1	453,5	512,2	391,3



sich hier wie bei der Fluoridvergiftung um Phosphoglycerinsäure handelt, auch aus dem leicht spaltbaren Hexosediphosphat unter Einfluß von m/32 $CaCl_2$ entstehen mußte.

Das ist, wie Versuch 3 zeigt, der Fall. Aus den Hydrolysenkurven II und K geht mit aller Deutlichkeit hervor, daß sich unter m/32 $CaCl_2$ die Umwandlung der Hexosediphosphorsäure in einen schwer spaltbaren Ester vollzogen hat. Zwar ist diese Umwandlung nicht so vollständig wie bei der Fluoridvergiftung, vielmehr sind noch erhebliche Mengen Hexosediphosphorsäure übrig geblieben. Aber die Wirkung dieser Ca-Konzentration ist eindeutig und kontrastiert stark mit der einer 2 m $CaCl_2$-Lösung. Unter deren Einwirkung ist, wie der Verlauf der Hydrolysenkurve I zeigt, die zugesetzte Hexosediphosphorsäure nicht nur nicht umgewandelt sondern anscheinend sogar vermehrt. In Bestätigung von Versuch 2 liegt auch hier dem Verschwinden von anorgan. Phosphorsäure unter 2 m $CaCl_2$-Wirkung die Bildung einer leicht spaltbaren Verbindung, vielleicht Hexosediphosphorsäure, zugrunde. Prinzipiell das gleiche Ergebnis wurde auch in mehreren Versuchen mit Froschmuskulatur gewonnen, jedoch war der Effekt in der Froschmuskulatur geringer als in Warmblütermuskulatur.

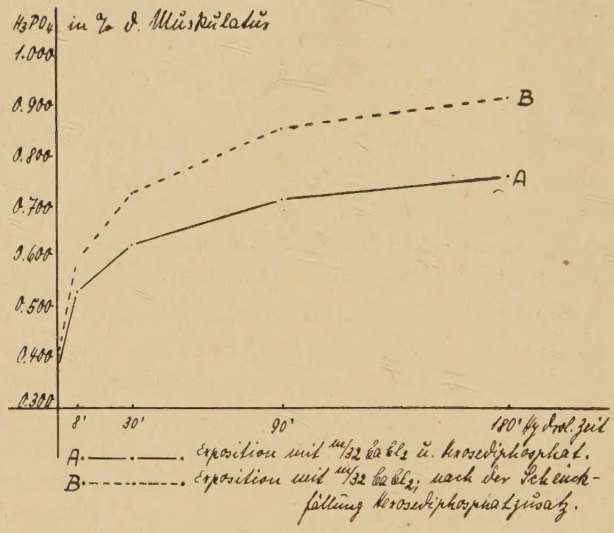
Auf Grund der bisherigen Ergebnisse wurde nun versucht, Phosphoglycerinsäure aus Kaninchenmuskulatur nach Einwirkung von m/32 $CaCl_2$ unter Zusatz von Hexosediphosphat zu isolieren. Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die Angaben von Embden, Deuticke u. Kraft[6]) bezüglich der Darstellung von Phosphoglycerinsäure aus fluoridvergifteter Kaninchenmuskulatur.

Versuch 4

(Prot. Nr. 9. 22. IV. 36.)

1,9 kg Kaninchenmuskelbrei wurden 4 Stunden bei 12° in 9,5 l m/32 $CaCl_2$-Lösung, die 9,5 g organ. H_3PO_4 als Hexosediphosphat enthielt, exponiert. Anschließend erfolgte die Schenckfällung. Am nächsten Tage wurde das Schenckfiltrat mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert und entlüftet und an einem aliquoten Teil die Hydrolysenkurve aufgenommen, deren Verlauf (siehe umstehende Figur) wiederum die Überführung des Hexosediphosphates in eine schwer spaltbare Verbindung bestätigt.

Versuch 4, Hydrolysenkurven.



Die Hauptfiltratmenge wurde mit Natronlauge schwach lackmusalkalisch gemacht und pro 1 mit 150 ccm 10%igem Kupfersulfat und 100 ccm Kalkmilch versetzt. Nach Zerlegen des abgetrennten Kupferkalkniederschlages mit 25%iger Schwefelsäure unter Eiskühlung und Abtrennung des Calciumsulfates wurde das so gewonnene Filtrat mit Schwefelwasserstoff entkupfert, die überschüssige Schwefelsäure weitgehend mit heißgesättigter Barytlauge entfernt (die Reaktion blieb stark kongosauer), das Filtrat im Vakuum auf 900 ccm eingeengt und mit gesättigter Bleizuckerlösung genau ausgefällt. Der Bleizuckerniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die Reste der Schwefelsäure aus dem Filtrat mit heißgesättigter Barytlauge völlig entfernt. Die Reaktion war immer noch stark kongosauer. Das abermals im Vakuum auf 300 ccm eingeengte Filtrat wurde vorsichtig weiter mit handwarmer Barytlösung bis zur schwach kongosauren Reaktion versetzt. Dabei fiel ein zunächst amorpher Niederschlag aus, der sich nach 24-stündigem

Stehn im Eisschrank teilweise zu wunderschönen, einheitlichen Kristallen umgewandelt hatte, die ihrer Form nach mit denen des sauren Bariumsalzes der Phosphoglycerinsäure identisch waren. Nach 14 Tagen wurde der fast völlig kristallinische Niederschlag abgesaugt und mit Aethylalkohol und Aceton gewaschen.

Ausbeute: 4,08 g Rohsubstanz.

Nach Umkristallisation durch Lösen in der gerade ausreichenden Menge 2n HCl und Wiederausfällen durch vorsichtigen Ammoniakzusatz verblieben 3,16 g analysenreiner Substanz, die als das saure Bariumsalz der in wässriger Lösung linksdrehenden Phosphoglycerinsäure identifiziert wurde.

Analytische Belege.

I.) Elementar-Analyse.

Ein Teil der einmal umkristallisierten Substanz wurde im evakuierten Schwefelsäure-Exsikkator weiter getrocknet und erreichte scheinbar nach mehreren Monaten ein konstantes Gewicht mit einem Kristallwassergehalt, das unter 1 Mol. lag. Der zweite Teil wurde an der Luft bis zur Konstanz getrocknet und enthielt auf Grund der unten angegebenen P und Ba-Bestimmung noch 1,736 Mol Kristallwasser. Dieses Ergebnis stimmt gut überein mit Angaben von Embden, Deuticke u. Kraft[6]), die nach 13 tägigem Trocknen bei 56° bei Gewichtskonstanz einen Kristallwassergehalt fanden, der zwischen $1\,^1/_2$ und 2 Mol lag.

Ba und P-Analysen:

0,1188 g Substanz: 0,0786 g $BaSo_4$.

Das Filtrat der Ba-Bestimmung wurde auf 200 ccm aufgefüllt, und in je 15 ccm nach Veraschung mit 2 ccm conc. Schwefelsäure und Perhydrol die Phosphorsäure nach Embden bestimmt.

Niederschlag: 0,0698 g und 0,0699 g.

		% Ba	% P
$C_3H_5O_7PBa$:	Ber.:	42,74	9,66
	Gef.:	38,95	8,78

Verhältnis: P : Ba = 100 : 100,14.

Aus den Analysen errechnet sich ein Wassergehalt von 1,736 Mol. H_2O.

C und H-Analysen: (Verbrennung mit Bleichromat-Kaliumchlorat, ausgeführt im Laboratorium Schoeller, Berlin-Schmargendorf.)

5,139 mg; 4,771 mg Subst.: 1,93; 1,76 mg CO_2, 1,23; 1,17 mg H_2O.

		% C		% H	
$C_3H_5O_7PBa + 1{,}736\ H_2O$:	Ber.:	10,21		2,42	
	Gef.:	10,24	10,06	2,68	2,74

II.) Spezifische Drehung.

a) der freien Phosphoglycerinsäure.

Eine durch Umsetzung des zweimal umkristallisierten analysenreinen Bariumsalzes mit n — H_2SO_4 in geringem Überschuß gewonnene Lösung zeigte im 2 dm-Rohr einen Drehungswinkel von — 0,76°. Die Lösung war frei von anorganischer Phosphorsäure und enthielt auf Grund der H_3PO_4 — Bestimmung nach Veraschung 3,2512 % freie Phosphoglycerinsäure.

α_D = — 11,69° (berechnet für die freie Säure.)

b) des tertiären Na-Salzes.

Nach Versetzen der gleichen Lösung mit Natronlauge bis zur gegen Lackmus schwach alkalischen Reaktion ergab sich im 2 dm — Rohr ein Drehungswinkel von + 0,42°. Die Lösung enthielt jetzt 1,9723 % tert. Na-Phosphoglycerinat.

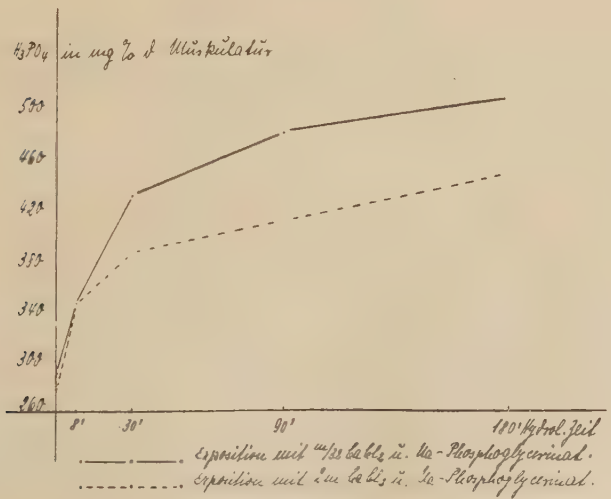
α_D = + 10,65° (berechnet für tert. Na-Salz.)

Embden, Deuticke u. Kraft[6]) fanden — 11,91°, E. Lehnartz[15]) für eine aus Hefe dargestellte Substanz — 11,30° für die freie Säure.

Demnach können wir als ein Umwandlungsprodukt der Hexosediphosphorsäure im Muskelbrei nach Einwirkung der schwächeren Ca-Konzentration und als „Syntheseprodukt" dieser Ca-Konzentration überhaupt die Phosphoglycerinsäure ansehen. Jedoch ist die Ausbeute an Phosphoglycerinsäure unter Calciumwirkung, wie schon der Verlauf der Hydrolysenkurven vermuten ließ, bei weitem nicht so groß wie nach Fluorideinwirkung. In einem sehr ähnlich angestellten Versuch, bei Verwendung von 2 kg Muskelbrei unter Zusatz von 10 g organ. H_3PO_4 als Hexosediphosphat und m 50 NaF konnten z. B. Embden, Deuticke u. Kraft (a. a. O. S. 24 Vers. 3) 19,7 g Rohsubstanz — statt 4 g in meinem Versuch — gewinnen.

Einen Grund für das vom Verhalten des Fluorids verschiedene Verhalten des Calciums zeigen die Hydrolysenkurven von Versuch 5. In diesem Versuch wurde Froschmuskelbrei mit 2 m und m/32 $CaCl_2$ unter Zusatz von Na-Phosphoglycerinat (pro g Muskulatur 10 mg organ. H_3PO_4) zwei Stunden bei 20° exponiert. Dabei war die unter m/32 $CaCl_2$-Einwirkung stehende

Versuch 5
(Prot. Nr. 6. 8. I. 36.)



Phosphoglycerinsäure gegenüber der mit 2 m $CaCl_2$ exponierten Phosphoglycerinsäure teilweise in einen leichter spaltbaren Ester, und zwar, wie weitere Versuche (s. S. 21) wahrscheinlich machen, in Hexosediphosphorsäure, übergeführt.

Ein weiterer wichtiger Grund für die geringe Phosphoglycerinsäurebildung nach m/32 $CaCl_2$-Einwirkung liegt darin, daß die Spaltung der gebildeten Phosphoglycerinsäure bei der optimalen Konzentration von m/32 $CaCl_2$ nicht so völlig gehemmt ist wie bei den optimalen Fluoridkonzentrationen. Die Spaltung der Phosphoglycerinsäure, bestimmt an der Zunahme der anorgan. Phosphorsäure bei der Exposition von Muskelbrei mit Phosphoglycerinsäure (10 mg organ. H_3PO_4 pro g Muskelbrei) und m/32 $CaCl_2$ gegenüber einem Kontrollansatz mit $CaCl_2$ allein, betrug in verschiedenen Versuchen innerhalb von zwei Stunden bei 20° 12—18 %. Sie ist weitgehend von der Ca-Konzentration abhängig, wie Versuch 6 zeigt; mit fallender Ca-Konzentration nimmt der spaltungshemmende Einfluß des Calciums fortschreitend ab.

Versuch 6

(Prot. Nr. 32a. 4. V. 37.)

Zweistündige Exposition von Froschmuskelbrei mit 2 m bis m/128 $CaCl_2$ unter Zusatz von Na-Phosphoglycerinat (10 mg organ. H_3PO_4 pro g Muskulatur).

$CaCl_2$-Konz.	2 m	m	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128
Spaltung in % der zuges. Phosphoglycerinsäure	1,4	1,84	2,25	2,38	5,71	8,13	12,23	15,50	17,01

In dem Maße, in dem bei sinkender Ca-Konzentration die Phosphoglycerinsäure wieder aufgespalten wird, nimmt auch die Milchsäurebildung im Muskelbrei aus zugesetztem Glykogen wieder zu, wie Versuch 7 zeigt. Während in der frischen Muskulatur in diesem Versuch der Milchsäuregehalt nach 2-stündiger Exposition mit 0,4 % Glykogen von einem Anfangsgehalt von

218 mg% auf 481 mg% angestiegen war, wurde die Milchsäurebildung in den Ansätzen mit den höheren Ca-Konzentrationen nicht nur gehemmt, sondern merkliche Milchsäure-

Versuch 7

(Prot. Nr. 33. 12. V. 37.)

2-stündige Exposition von Froschmuskelbrei mit 2 m bis m/128 $CaCl_2$ und 0,4% Glykogen.

mengen wurden unter den praktisch anaeroben Bedingungen zum Verschwinden gebracht, und erst jenseits einer Ca-Konzentration von m/32 konnte die Muskulatur, wenn auch noch verzögert, Glykogen in Milchsäure umsetzen. Dieses Verhalten des Calciums wurde ebenfalls in weiteren, hier nicht veröffentlichten Versuchen bestätigt.

Das Verschwinden von anorgan. Phosphat unter m/32 $CaCl_2$ — Einwirkung kann also bisher erklärt werden durch die sicher nachgewiesene Anhäufung von Phosphoglycerinsäure und durch die wahrscheinlich gemachte gleichzeitige Bildung eines zweiten, leichter spaltbaren H_3PO_4 — Esters. Um festzustellen, aus welchem Grunde das Minimum an anorgan. Phosphat bei m/32 $CaCl_2$ liegt, also bei einer Konzentration, bei der die Spaltung der Phosphoglycerinsäure bereits einen verhältnismäßig

großen Umfang angenommen hat, wurde außer für die Phosphoglycerinsäure auch, und zwar gleichzeitig, für die Hexosediphosphorsäure die Abhängigkeit ihres Umsatzes von der Ca-Konzentration geprüft. Die Spaltung der Phosphoglycerinsäure wurde an der Zunahme der anorganischen Phosphorsäure gegenüber Kontrollansätzen mit $CaCl_2$ — Zusatz allein gemessen, die Spaltung der Hexosediphosphorsäure durch Zurückbestimmen des nicht umgesetzten Hexosediphosphatanteiles. Dabei erwies es sich als notwendig, eine Hexosediphosphatbestimmungsmethode erst auszuarbeiten; denn eine gesonderte Bestimmung von Hexosemono- und Hexosediphosphat war bisher nicht möglich. Die von Embden und Jost [16]) angegebene Lactacidogenbestimmungsmethode, eine Reduktionsmethode, ergibt nur in Abwesenheit von Hexosediphosphat brauchbare Werte für Hexosemonophosphat, sie erfaßt bei Anwesenheit von Hexosediphosphat dieses mit und liefert wegen der verschiedenen spezifischen Reduktion der beiden phosphorylierten Hexosen dann keine brauchbaren Werte.

Methode zur Bestimmung der Hexosediphosphorsäure in der Muskulatur.

Die von mir ausgearbeitete Methode, die in einer weiteren Arbeit „Über das Vorkommen von Hexosediphosphorsäure unter physiologischen und pathologischen Bedingungen in der Muskulatur" bereits Verwendung fand, beruht auf folgendem Prinzip: Nach Young [17]) wird bei der Osazonbildung von Hexosediphosphorsäure pro Mol Hexosediphosphorsäure ein Mol Phosphorsäure abgespalten. Aus der Vermehrung des anorganischen Phosphates bei der Osazonbildung läßt sich also die Menge der vorhandenen Hexosediphosphorsäure berechnen.

Ausführung:

In flüssiger Luft gefrorene und zerkleinerte oder mit der Schere zerkleinerte Muskulatur wird in Erlenmeyerkölbchen gefüllt, die pro g Muskulatur mit 10 ccm einer Lösung von

5% Trichloressigsäure in 1%iger Salzsäure vorgewogen sind. Nach Zurückwägen und Stehen über Nacht im Eisschrank wird in aliquoten Teilen des Filtrates die anorganische Phosphorsäure (einschließlich Phosphokreatinphosphorsäure) nach Embden [11]) bestimmt. 10 ccm des Filtrates werden dann mit Natronlauge gegen einen Tropfen Bromthymolblau genau neutralisiert, mit 5 ccm einer filtrierten Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin, die auf 15 ccm Wasser 1 g Phenylhydrazinhydrochlorid enthält, und 2,5 ccm einer gesättigten Natriumacetatlösung versetzt und auf 25 ccm aufgefüllt. (Wird ein anderes Volumen als 25 ccm gewählt, so muß das Phenylhydrazin immer $^1/_5$ und das Natriumacetat $^1/_{10}$ des Endvolumens betragen.) Nach gründlichem Durchmischen wird diese Flüssigkeit zur Osazonbildung genau 2 Stunden im Wasserbad bei 70° in zugeschmolzenen Röhrchen exponiert. In je 10 ccm der abgekühlten und filtrierten Expositionsflüssigkeit (in Doppelbestimmungen) wird das anorgan. Phosphat gefällt. Die direkte Anwendung der Phosphatbestimmung nach Embden ist dabei nicht möglich wegen der reduzierenden Wirkung des Phenylhydrazins auf das Molybdän des Fällungsreagens, das anorgan. Phosphat muß deshalb auf dem Umwege der Magnesiafällung bestimmt werden. Je 10 ccm werden mit 10%igem Ammoniak gegen einen Tropfen Bromthymolblau neutralisiert, versetzt mit 3 ccm Magnesiamixtur und einem Drittel des bisherigen Volumens (etwa 4,4 ccm) 10%igem Ammoniak, so daß die Ammoniakendkonzentration 2,5% beträgt. Die Magnesiafällung soll möglichst immer aus einem Volumen von 10 ccm erfolgen, und zwar sollen in diesen 10 ccm nicht weniger als 1 mg anorgan. H_3PO_4 enthalten sein. Andernfalls ist die Magnesiafällung zu verlustreich. Muß einmal ein größeres Volumen gewählt werden, dann müssen Ammoniak- und Magnesiamixturmengen zur Wahrung der Konzentrationen in entsprechendem Maße gesteigert werden. Die Magnesiafällungen bleiben nach mehrmaligem Umschütteln über Nacht im Eisschrank stehen. (An mehreren Reihenversuchen war die Magnesiafällung nach 4 Stunden noch nicht beendet.) Das

Magnesiumammoniumphosphat wird zusammen mit dem ausgefallenen Phenylhydrazin durch gewöhnliche 5,5 cm Filter filtriert. Kölbchen und Filter werden 2 mal mit je 2,5 ccm Magnesiamixtur gewaschen, dann zur Entfernung des Phenylhydrazins 1 mal mit 2,5 ccm 96 %igem Aethylalkohol und zur Entfernung des Alkohols wieder 2 mal mit je 2,5 ccm Magnesiamixtur. Die fast weißen Niederschläge werden danach mit 10 %iger Salpetersäure gelöst (auch die Fällungskölbchen mit Salpetersäure ausspülen!) und quantitativ in Erlenmeyerkölbchen übergespült. Nach Neutralisieren und Auffüllen auf 30 oder 60 ccm wird die anorgan. H_3PO_4 jetzt nach Embden gefällt. (Bei Anwesenheit von Hexosediphosphorsäure löst sich der Magnesiumammoniumphosphat-Niederschlag in Salpetersäure mit leuchtend gelber Farbe, die geradezu als Indikator auf Hexosediphosphorsäure angesehen werden kann. Es handelt sich wahrscheinlich um ein in organischen Lösungsmitteln unlösliches Magnesiumsalz des Osazons der Hexosediphosphorsäure, das die Phosphatbestimmung allerdings nicht beeinflußt.) Die Differenz des jetzt ermittelten H_3PO_4-Gehaltes gegen den direkt im Filtrat bestimmten Gehalt multipliziert mit zwei gibt den Gehalt an Hexosediphosphat-H_3PO_4 an. Die Ausbeute an Hexosediphosphorsäure mit dieser Methode liegt zwischen 96 und 99, meist zwischen 96 und 97 %.

Analytische Belege:

Als Zusatzsubstanz wurde hexosediphosphoraures Natrium verwandt, das jedesmal aus dem Calciumsalz durch Umsetzen mit Natriumoxalat gewonnen wurde. Das hexosediphosphorsaure Calcium wurde aus Candiolin über das Blei- und Bruzinsalz dargestellt. Es muß vor Licht geschützt aufbewahrt werden, da es andernfalls unter Abspaltung von Phosphorsäure zu einem Gleichgewicht mit Monophosphat kommt. Genau wie Hexosediphosphat aus Candiolin dargestellt verhält sich auch Muskelhexosediphosphat, isoliert aus Preßsaft unter Fluorideinfluß. (siehe Nr. 5.)

Tabelle I

Nr.	Zugesetzt mg Hexosediphosphat-H_3PO_4	Bei der Exposition abgespalten mg H_3PO_4	Ausbeute in %
1	2,0	0,9890	98,90
2	4,0	1,9204	96,02
3	5,0	2,4144	96,58
4	15,0	7,2363	96,48
5	5,0	2,4325	97,30

Wie die folgende Tabelle zeigt, nimmt die prozentische Ausbeute mit steigender Hexosediphosphat-Konzentration ab.

Tabelle II

Zugesetzt mg Hexosediphosphat-H_3PO_4	Bei der Exposition abgespalten mg H_3PO_4	Ausbeute in %
2,0	0,9890	98,90
4,0	1,9748	98,74
8,0	3,8520	96,30
16,0	7,6600	95,75
32,0	15,2312	95,20

Der Einwand, daß bei der gewählten Expositions-Temperatur und Zeit andere H_3PO_4-Ester des Muskels hydrolytisch gespalten werden, kann durch folgende experimentellen Befunde widerlegt werden.

1. Die prozentische Ausbeute an Hexosediphosphorsäure nach Zusatz von Hexosediphosphorsäure zur nach Schenck oder mit Trichloressigsäure-Salzsäure gefällten frichen Muskulatur ist die gleiche wie bei der Bestimmung an der reinen Hexosediphosphatlösung in entsprechender Konzentration. (Tabelle III)

Tabelle III

Nr.	Zugesetzt mg Hexosediphosphat H_3PO_4	mg anorg. H_3PO_4 im Gesamtansatz vor der Exposition	mg anorg. H_3PO_4 im Gesamtansatz nach der Exposition	mg H_3PO_4 abgespalten bei der Exposition	Ausbeute in %	Ausbeute in % an der reinen Lösung
1	3,0	7,859	9,300	1,441	96,06	96,58
2	10,0	6,421	11,294	4,873	97,46	97,30
3	56,0	15,038	41,905	26,867	95.95	96,02

2. Die Werte an anorganischem Phosphat in Schenck- oder Trichloressigsäurefiltraten frischer Muskulatur nach der Exposition mit Phenylhydrazin differieren gegen das direkt bestimmte Phosphat maximal um 2%, in der Mehrzahl um weniger als ± 1%. Die Differenz liegt also durchaus im Bereich der Fehlerbreite. (Tabelle IV)

Tabelle IV

	A	B	
Nr.	Anorgan. H_3PO_4 in mg% der Muskulatur vor der Exposition	Anorgan. H_3PO_4 in mg% der Muskulatur nach der Exposition	Differenz in % von A
1	264,1	269,3	+2,0
2	299,2	302,9	+1,23
3	283,4	284,4	+0,35
4	285,8	286,2	+0,14
5	296,4	295,6	−0,27
6	309,3	307,9	−0,45

3. Alle bisher untersuchten H_3PO_4-Ester des Muskels spalten unter den angegebenen Bedingungen der Hexosediphosphatbestimmung kein anorgan. Phosphat ab. Wegen Fehlens der betreffenden Substanz wurden nicht untersucht: Phosphobrenztraubensäure, Glycerinaldehydphosphorsäure, Dioxyacetonphosphorsäure und Pentosephosphorsäure. Von allen untersuchten Substanzen wurden jeweils 10 mg organ. H_3PO_4 zugesetzt. (Tab. V.)

Tabelle V

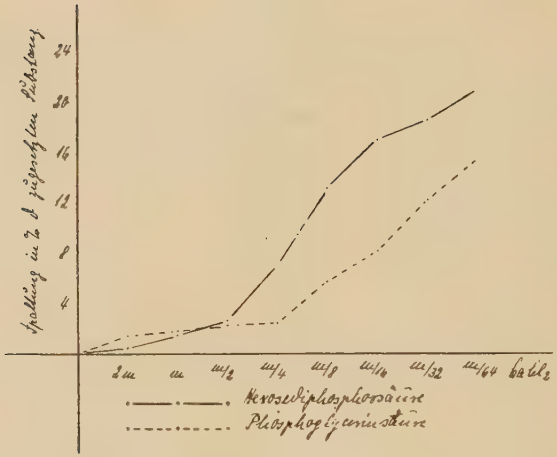
Zugesetzte Substanz	mg anorg. H_3PO_4 vor der Exposition	mg anorg. H_3PO_4 nach der Exposition
Glycerinphosphorsäure	0,9436	0,9251
Phosphoglycerinsäure	0,0764	0,0753
Hexosemono-H_3PO_4	—	—
Pyrophosphorsäure	0,5147	0,5179
Inosinsäure	—	—
Adenylsäure	—	—
Adenylpyro-H_3PO_4	3,966	3,975

Das Ergebnis eines Versuches, in dem nach Einwirkung verschiedener Ca-Konzentrationen auf Froschmuskelbrei die anorgan. H_3PO_4 und die Hexosediphosphorsäure bestimmt und der Umsatz zugesetzter Hexosediphosphorsäure und Phosphoglycerinsäure bei den gleichen Ca-Konzentrationen verfolgt wurde, ist wiedergegeben als

Versuch 8

(Prot. Nr. 32. 4. V. 37.)

$CaCl_2$— Konz.	A-Wert	2 m	m	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64
Anorg H_3PO_4 in mg% der Muskulatur	295,0	259,0	286,2	296,9	286,1	249,0	208,4	180,4	169,2
Hexosediphosphat-H_3PO_4 in mg% der Muskulatur	—	20,4	—	—	—	—	31,7	47,0	81,3



In diesem Versuch liegt das zweite Minimum an anorganischem Phosphat nicht bei m/32 sondern bei m/64 $CaCl_2$. Bei dieser Calcium-Konzentration ist auch die Hexosediphosphat-Anreicherung am stärksten, sie deckt aber in der Bilanz ebenso wenig wie in m/32 und m/16 $CaCl_2$-Lösung die gegenüber dem A-Wert verminderte anorgan. Phosphorsäure. Vielmehr sind merkliche Mengen von anorganischem Phosphat verschwunden, höchstwahrscheinlich unter Phosphoglycerinsäurebildung, und zwar in der bisher optimalen Konzentration von m/32 am stärksten; hier beträgt die Differenz zwischen dem A-Wert und der Summe der anorganischen und Hexosediphosphat — H_3PO_4 67,6 mg% gegenüber 55 und 45 mg% in den beiden anderen $CaCl_2$-Konzentrationen.

Ferner zeigt dieser Versuch, daß es sich bei dem leicht hydrolysierbaren Ester, der das erste Minimum der anorganischen Phosphorsäure bei 2 m $CaCl_2$ verursacht, (siehe die Versuche 2 u. 3), tatsächlich um Hexosediphosphorsäure handelt; sie ließ sich in den folgenden Ca-Konzentrationen bis m/8 nicht nachweisen. In Übereinstimmung damit ist die in der ausgezogenen Kurve wiedergegebene Aufspaltung der zugesetzten Hexosedi-

phosphorsäure durch 2 m $CaCl_2$-Lösung so gut wie völlig gehemmt, durch schwächere Ca-Konzentrationen dagegen weniger. Dieser, den Hexosediphosphat-Umsatz hemmende Ca-Einfluß ist von m/2 $CaCl_2$ ab geringer als die hemmende Wirkung, die das Calcium auf die Phosphoglycerinsäurespaltung ausübt, wie der Verlauf der gestrichelten Kurve zeigt. Demnach kann innerhalb dieses Bereiches, von m/4 bis m/64 $CaCl_2$, Hexosediphosphat verschwinden unter Phosphoglycerinsäurebildung, die ihrerseits wieder in Abhängigkeit von der Ca-Konzentration in verschieden großem Umfange bei der Dephosphorylierung in Milchsäure umgesetzt wird. (vgl. Versuch 7.) Die in der Bilanz erscheinende Menge anorganischer Phosphorsäure ist also abhängig von der durch das Calcium beeinflußten Einstellung der verschiedenen Gleichgewichte.

Das Ergebnis dieses Versuches, das sowohl die geringere Ausbeute an Phosphoglycerinsäure in dem Darstellungsversuch 4 wie auch den steileren Verlauf der Hydrolysenkurven in Vergleich zu den bei Fluoridzusatz beobachteten erklärt, wurde in einem weiteren Versuch (Versuch 9) bestätigt. Hier war in der ganzen Konzentrationsreihe von 2 m bis m/128 $CaCl_2$ nicht nur das Verhalten von anorganischer H_3PO_4 und Hexosediphosphorsäure, sondern auch das der Pyrophosphorsäure verfolgt worden.

Versuch 9

(Prot. Nr. 28. 6. III. 37.)

2-stündige Exposition von Froschmuskelbrei in 2 m bis m/128 $CaCl_2$ bei 20°.

$CaCl_2$— Konz.	A-Wert	2 m	m	m/2	m/4	m/8	m/16	m/32	m/64	m/128
Anorg. H_3PO_4 in mg% der Muskulatur	314,6	254,4	304,2	321,9	278,8	233,5	179,1	140,8	127,2	139,7
Hexosediphosphat-H_3PO_4 in mg% der Muskulatur	—	60,7	—	—	—	—	30,7	41,2	46,5	77,1
Pyrophosphat-H_3PO_4 in mg% der Muskulatur	31,9	33,5	9,4	1,9	11,8	4,4	–	—	—	—

Die unter 2 m $CaCl_2$ verschwundenen 60,2 mg% anorgan. H_3PO_4 sind in diesem Versuch bei praktisch gleichbleibendem Pyrophosphatgehalt vollständig in Hexosediphosphorsäure umgewandelt worden. In den weiteren Konzentrationen ließ sich wieder kein Hexosediphosphat nachweisen, erst von m/16 $CaCl_2$ ab kam es zu einem Hexosediphosphatanstieg. Das Pyrophosphat, dessen Spaltung bei 2 m $CaCl_2$ total gehemmt war, wurde mit fallender Ca-Konzentration zunehmend aufgespalten und war von m/16 ab überhaupt nicht mehr nachweisbar. Dieses Verhalten des Pyrophosphates, seine Unangreifbarkeit bei hoher Ca-Konzentration und die Spaltungshemmung, die niedrigere Ca-Konzentrationen ausüben, konnte in mehreren Versuchen bestätigt, ein Einfluß des Calciums somit auch auf den Pyrophosphatstoffwechsel sichergestellt werden.

Nach den sämtlichen in dieser Arbeit mitgeteilten Versuchen greift also das Calcium weitgehend in den Kohlehydratabbau der Muskulatur ein. In Abhängigkeit von der Konzentration kann es durch Phosphorylierung von Kohlehydrat die Glykolyse einleiten, den Umsatz des entstandenen Hexosediphosphates hemmen oder fördern und noch einmal an einem tieferen Abbauprodukt der Kohlehydrate, nämlich der aus Hexosediphosphorsäure entstehenden Phosphoglycerinsäure, angreifen und deren Umsatz zu Milchsäure entscheidend beeinflussen. Sicherlich sind die verwandten Calciumkonzentrationen zum Teil ungewöhnlich hoch, unphysiologisch, aber es ist zu berücksichtigen, daß im Gewebsbrei die Bedingungen ungünstiger sind als im intakten lebensfrischen Organ, daß auch die Verteilung des Calciums in der Muskelzelle wahrscheinlich keine gleichmäßige ist, so daß an bestimmten Zellorten Konzentrationen vorliegen können, die auf den Kohlehydratumsatz von Einfluß sind.

Zusammenfassung:

1. Die Ergebnisse H. Langes über die zweiphasige Wirkung des Calciums auf den Gehalt des Muskelbreies an anorgan. Phosphat werden bestätigt.
2. Eine Methode der Hexosediphosphatbestimmung ist ausgearbeitet worden, die es gestattet, Hexosediphosphorsäure auch in Gegenwart von Hexosemonophosphorsäure zu bestimmen.
3. Mittels dieser Methode ist festgestellt worden, daß das erste Minimum an anorganischem Phosphat unter 2 m $CaCl_2$ auf der Umwandlung des gesamten verschwindenden anorganischen Phosphates bei gleichbleibendem Pyrophosphatgehalt in Hexosediphosphorsäure beruht.
4. Das zweite Minimum bei m/32 oder m/64 $CaCl_2$ ist vornehmlich durch Anhäufung von Phosphoglycerinsäure verursacht, die als saures Bariumsalz isoliert und identifiziert wurde. Daneben findet sich auch bei dieser Calcium-Konzentration etwas Hexosediphosphat.
5. Die Pyrophosphatspaltung wird in den höchsten untersuchten Calcium-Konzentrationen völlig oder teilweise gehemmt, in den niederen Konzentrationen dagegen unbeeinflußt gelassen.

Herrn Prof. Dr. H. J. Deuticke bin ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Literatur-Angaben.

1. G. Embden u. E. Lehnartz: H. S. 134, 243 (1924)
2. H. J. Deuticke: H. S. 141, 196 (1924)
3. G. Embden u. C. Haymann: H. S. 137, 154 (1924)
4. G. Embden u. M. Zimmermann: H. S. 141, 225 (1925)
5. K. Lohmann: Biochem. Zs. 222, 324 (1930)
6. Embden, Deuticke u. Kraft: H. S. 230, 12 (1934) und Klin. Wschr. 12, 213 (1933)
7. Embden u. Deuticke: H. S. 230, 50 (1934)
8. K. Lohmann u. O. Meyerhof: Biochem. Zs. 273, 60 (1934)
9. H. Lange: H. S. 137, 105 (1924)
10. C. Emmrich u. H. Lange: H. S. 141, 242 (1924)
11. G. Embden: H. S. 113, 138 (1921)
12. K. Lohmann: Naturw. 16, 289 (1928) und Biochem. Zs. 202, 466; 203, 164 u. 172 (1928)
13. E. Lehnartz: H. S. 179. 1 (1928)
14. K. Lohmann: Biochem. Zs. 194, 314 (1928); 202, 466 (1928)
15. E. Lehnartz: H. S. 230, 90 (1934)
16. G. Embden u. H. Jost: H. S. 179, 24 (1928); 203, 48 (1931)
17. Harden u. Young: Proc. Chem. Soc. 21, 189 (1905): Young, Biochem. Zs. 32, 177 und 32, 188 (1911).

Lebenslauf.

Ich, Siegfried Hollmann, evangelischer Konfession, bin am 1. Mai 1914 als Sohn des Kaufmannes Karl Hollmann und seiner Frau Margarethe geb. Baumann zu Aachen geboren. 1932 erhielt ich das Reifezeugnis am staatlichen Gymnasium zu Jülich. Im Wintersemester 1932/33 begann ich in Bonn mit dem Studium der Medizin. Nach dem Wintersemester 1934/35 bestand ich hier das Physikum. Im Frühjahr 1938 meldete ich mich zum medizinischen Staatsexamen, das ich am 14. Juni bestand.